

- CHESHKOV, Dokl. Akad. Nauk SSSR 144, 788 (1962); E. O. FISCHER, K. ÖFELE, H. ESSLER, W. FRÖHLICH, J. P. MORTENSEN & W. SEMMLINGER, Z. Naturforsch. 13b, 458 (1958); E. O. FISCHER & K. ÖFELE, Chem. Ber. 91, 2395 (1958); R. BURTON, M. L. H. GREEN, E. W. ABEL & G. WILKINSON, Chemistry & Ind. 1958, 1592.
- [5] A. E. MARTELL & M. CALVIN, Die Chemie der Metallchelate-Verbindungen, S. 143, Verlag Chemie, Weinheim 1958.
- [6] L. TSCHUGAEFF, Ber. deutsch. chem. Ges. 41, 2222 (1908); G. T. MORGAN, S. R. CARTER & W. F. HARRISON, J. chem. Soc. 127, 1917 (1925); F. P. J. DWYER & F. LIONS, J. Amer. chem. Soc. 72, 1545 (1950); E. GONICK, W. C. FERNELIUS & B. E. DOUGLAS, *ibid.* 76, 4671 (1954).
- [7] J. BJERRUM, Chem. Reviews 46, 381 (1950); J. BJERRUM & E. J. NIELSEN, Acta chem. scand. 2, 316 (1948); R. J. BRUEHLMANN & F. H. VERHOEK, J. Amer. chem. Soc. 70, 1401 (1948); A. GERO & J. J. MARKHAM, J. org. Chemistry 16, 1835 (1951).
- [8] H. C. BROWN & X. R. MIHM, J. Amer. chem. Soc. 77, 1723 (1955); C. GOLUMBIC & M. ORCHIN, J. Amer. chem. Soc. 72, 4145 (1950).
- [9] R. K. MURMANN & F. BASOLO, J. Amer. chem. Soc. 77, 3484 (1955); H. H. JAFFÉ & G. O. DOAK *ibid.* 77, 4441 (1955).
- [10] N. IKEKAWA, Y. SATO & T. MAEDA, Pharm. Bull. (Tokyo) 2, 205 (1954) (Chem. Abstr. 50, 994e (1956)).
- [11] R. KESWANI & H. FREISER, J. Amer. chem. Soc. 71, 218 (1949); H. DE VRIES ROBLES, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 58, 111 (1939); H. ERLIENMEYER & M. LEO, Helv. 16, 1381 (1933).
- [12] K. A. JENSEN & A. FRIEDINGER, Chem. Zbl. 1944 I, 416.
- [13] A. ALMENNINGEN, O. BASTIANSEN & P. SVENDSAS, Acta chem. scand. 12, 1671 (1958).
- [14] V. SCHOMAKER & L. PAULING, J. Amer. chem. Soc. 61, 1769 (1939).
- [15] A. I. VOGEL, Practical Organic Chemistry, S. 931, Longmans, Green & Co., London 1959.
- [16] H. WYNBERG & A. LOGOTHETIS, J. Amer. chem. Soc. 78, 1958 (1956).
- [17] G. SCHWARZENBACH & W. BIEDERMANN, Helv. 31, 459 (1948).
- [18] I. HIRAO, J. pharmac. Soc. Japan 73, 1023 (1953) (Chem. Abstr. 48, 10724b (1954)).

192. Untersuchungen über die Reaktion von Peptiden mit Phenylisothiocyanat

Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Sequenzanalyse von Peptiden

2. Mitteilung

von **György Pataki**

(17. VII. 64)

Zum Nachweis der N-terminalen Aminosäure und zum stufenweisen Abbau von Peptiden eignet sich die Phenylisothiocyanat(PITC)-Methode von EDMAN [1]¹⁾.

Wir haben eine grössere Anzahl von Peptiden nach dem von SJÖQUIST [2] modifizierten Verfahren abgebaut und die Abbauprodukte dünnschichtchromatographisch [3] identifiziert. Hierbei konnten manchmal Nebenflecke beobachtet werden, und zwar besonders beim Abbau von grösseren Peptiden [4]. Da eine Reaktion der nicht N-endständigen Aminosäuren (vgl. SCHRAMM *et al.* [5]) schon früher [6] ausgeschlossen werden konnte, haben wir auf eine Beobachtung von SJÖQUIST aus dem Jahre 1959 [2] zurückgegriffen. Der schwedische Autor hat festgestellt, dass beim stufenweisen Abbau von Insulin schon im zweiten Abbauschritt «Artefakte» entstehen; nämlich die

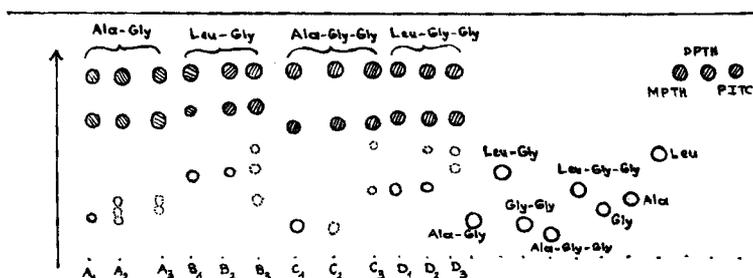
¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1765.

Phenylthiohydantoin(PTH)-Derivate von Glycin und von Phenylalanin, d.h. der N-terminalen Aminosäuren der unveränderten Insulinmolekel. Diese Erscheinung beruht darauf, dass die einmalige Umsetzung eines Peptids mit Phenylisothiocyanat nur unvollständig ist. SJÖQUIST hat gezeigt, dass die erwarteten PTH-Derivate dann ausschliesslich entstehen, wenn die Insulinmolekel und auch das entstandene Restpeptid dreimal nacheinander mit diesem Reagens umgesetzt werden [2].

Es ist aus der Literatur nicht zu entnehmen, ob diese Arbeitsweise auch von anderen Autoren verwendet wurde. Lediglich LAVER berichtet, dass die zweimalige Umsetzung von Hämoglobin mit PITC die Ausbeute an PTH-Valin nicht erhöhen soll [7]. Demgegenüber beobachteten CHERBULIEZ *et al.* [8] beim Abbau von Glycyl-Prolin im zweiten Abbauschritt neben PTH-Prolin auch Spuren von PTH-Glycin.

Dieser Befund und unsere eigenen Resultate [4] haben uns veranlasst, einige kleinere Peptide mit PITC umzusetzen und den Verlauf der Reaktion dünn-schichtchromatographisch zu überwachen. Hierzu eignet sich die kürzlich für den zerstörungsfreien Nachweis von Peptiden vorgeschlagene Technik [9].

Wir setzten zwei Di- und zwei Tripeptide mit PITC einmal, bzw. zweimal und dreimal nach SJÖQUIST [2] um und chromatographierten das Reaktionsgemisch nach jeder Umsetzung an Zinksilikat-haltigen Kieselgel-G-Schichten [9]. Wie die Abbildung zeigt, lassen sich nach einmaliger Umsetzung mit PITC neben den Phenylthiocarbamoyl (PTC)-Derivaten auch die unveränderten Peptide nachweisen. Eine quantitative Auswertung nach PURDY & TRUTER [10] ergab eine «Ausbeute» von 85–90% an den PTC-Peptiden²⁾. Nach dreimaliger Umsetzung mit PITC konnten wir nur noch unwesentliche Spuren von Leu-Gly feststellen. Manche Flecke dürften auf eine geringfügige Hydrolyse der Peptide hinweisen. So kann man z. B. nach dreimaliger Umsetzung von Ala-Gly mit PITC Spuren von Alanin und von Glycin auf dem Chromatogramm erkennen; Leu-Gly liefert unter den gleichen Bedingungen ebenfalls Spuren der freien Aminosäuren. Bei Ala-Gly-Gly liess sich Glycin nicht nachweisen, obschon ein schwacher Ninhydrin-positiver Fleck in der Höhe von Alanin auf eine schwache Hydrolyse hindeutet; ein weiterer Ninhydrin-positiver Fleck der schneller als Leucin wandert, konnte auch beobachtet werden³⁾. Bei Leu-Gly-Gly konnte neben Spuren von Leucin ein wei-



Dünn-schichtchromatogramm der Reaktionsprodukte von Di- und Tripeptiden mit PITC (A, B, C, D) und von Vergleichssubstanzen

Die Indices 1, 2 und 3 bedeuten: ein-, zwei- bzw. dreimalige Umsetzung mit PITC. Schraffierte Flecke: sichtbar im UV.-Licht (254 m μ); übrige Flecke sind Ninhydrin-positiv. – Fließmittel: *n*-Propylalkohol/Wasser 7:3 *v/v*.

²⁾ Diese «Ausbeute» schwankt stark von Experiment zu Experiment. Bei Leu-Gly z. B. beträgt sie $90 \pm 13\%$ (Mittelwert aus 5 Versuchen \pm Standardabweichung).

terer Ninhydrin-positiver Fleck, welcher langsamer als Leucin jedoch schneller als Glycin wandert, beobachtet werden³⁾. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieses Flecks entspricht etwa derjenigen von Leu-Gly. Bemerkenswert ist, dass wir bei den untersuchten Tripeptiden Gly-Gly nicht nachweisen konnten.

Es wäre zwar verfrüht allgemeine Schlüsse zu ziehen, jedoch glauben wir, dass unsere Resultate die auch bei kleineren Peptiden gelegentlich auftretenden «Artefakte» im Sinne von SJÖQUIST erklären dürften. Es wäre unserer Meinung nach empfehlenswert, die Umsetzung eines Peptids mit PITC dünn-schichtchromatographisch zu überwachen. Gegebenenfalls kann dann die Umsetzung, unter dünn-schichtchromatographischer Kontrolle, mehrmals wiederholt werden. Unser Vorgehen erlaubt jedoch ausser der Beurteilung des Reaktionsverlaufes auch eine Reinigung des PTC-Peptids, d. h. die Abtrennung der UV.- und Ninhydrin-positiven Reaktionsprodukte. Ausser der Chromatographie dürfte hierbei die «Dünnschicht-Fingerprint»-Technik nach WIELAND [11] von Bedeutung sein.

Experimentelles. – Die Umsetzung der Peptide mit PITC erfolgte nach SJÖQUIST [2]. Zur Chromatographie verwendeten wir Kieselgel-G-Schichten, welche Zinksilikat enthalten [3]. Die Chromatogramme wurden nach Trocknung im UV.-Licht (254 m μ ; UV.-Lampe der Fa. CAMAG, Muttenz, BL.) betrachtet und die UV.-positiven Flecke mit einem weichen Bleistift umrandet. Die Platte wurde anschliessend mit Ninhydrin besprüht und 15 min auf 60° erhitzt.

Zur Beurteilung des Reaktionsverlaufes diente die algebraische Methode von PURDY & TRUTER [10]. Hierzu wurde das Reaktionsgemisch gemeinsam mit einer Lösung des freien Peptides chromatographiert und die Auswertung erfolgte nach Anfärbung mit Ninhydrin nach der W⁺-Methode [10].

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einmaliger Umsetzung eines Peptids mit Phenylisothiocyanat lässt sich noch ein Teil des unveränderten Peptids dünn-schichtchromatographisch nachweisen. Durch Wiederholung der Reaktion kann die Ausbeute an Phenylthiocarbamoyl-Peptid erhöht werden.

Es wird vorgeschlagen die Entstehung des Phenylthiocarbamoyl-Peptids dünn-schichtchromatographisch zu überwachen. Die angegebene Technik eignet sich auch zur Reinigung und zur präparativen Isolierung von Phenylthiocarbamoyl-Peptiden.

Universitäts-Frauenklinik Basel
(Direktor: Prof. Dr. TH. KOLLER)

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. EDMAN, *Acta chem. scand.* **4**, 283 (1950).
- [2] J. SJÖQUIST, *Arkiv Kemi* **14**, 291 (1959).
- [3] M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI in E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin 1962; G. PATAKI, *Chimia* **18**, 23 (1964).
- [4] G. PATAKI, unveröffentlicht.
- [5] G. SCHRAMM, J. W. SCHNEIDER & F. A. ANDERER, *Z. Naturforsch.* **11 B**, 120 (1956).
- [6] G. PATAKI, Dissertation, Universität Basel 1962.
- [7] W. G. LAVER, *Biochim. biophysica Acta* **53**, 469 (1961).
- [8] E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER & J. RABINOWITZ, *Helv.* **43**, 1871 (1960).
- [9] G. PATAKI, *Chimia* **18**, 24 (1964).
- [10] S. J. PURDY & E. V. TRUTER, *Analyst* **87**, 802 (1962).
- [11] TH. WIELAND & D. GEORGOPOULOS, *Biochem. Z.*, im Druck.

³⁾ In früheren Versuchen [9] haben wir einen weiteren Ninhydrin-positiven Flecken festgestellt.